

⑯ 公開特許公報 (A) 平3-38592

⑯ Int. Cl. 5

C 07 F 9/10
A 61 K 31/685
33/06
35/78

識別記号

ADU
AED
ABE

府内整理番号

A
7431-4C
7431-4C
U
8412-4C

⑯ 公開 平成3年(1991)2月19日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全7頁)

⑯ 発明の名称 新規ホスファチジルコリンカルシウムとその製法

⑯ 特願 平1-173264

⑯ 出願 平1(1989)7月4日

特許法第30条第1項適用 Vol. 25, No. 3, 1989「医薬ジャーナル1989年3月号」に発表

⑯ 発明者 八木 晟 福岡県柏屋郡柏屋町仲原446-4

⑯ 出願人 八木 晟 福岡県柏屋郡柏屋町仲原446-4

⑯ 代理人 弁理士 門脇 清

明細書

3. 発明の詳細な説明

【発明の目的】

【産業上の利用分野】

本発明は、活性酸素抑制剤乃至抗炎症剤等として有用な新規ホスファチジルコリンカルシウム及びこれを天然物から製造する方法に関する。

【従来の技術】

イネ科の植物ハトムギ (*Coix lacryma-jobi L.* var. *ma-yuen* Stapf) の種子は、古来“薏苡仁”(ヨクイニン) と呼ばれ、漢方では、利尿によるネフローゼの治療、肺腫瘍の解毒排膿、筋肉の痙攣痛の緩解、扁平イボの消退などに効有りとされ、一部製剤化されているのみでなく、民間薬としてもハトムギ茶等として広く用いられている。

ところで、近來和漢薬に対する再評価が進む中で、既に1957年から翌年にかけて中山によりヨクイニンのエタノール抽出液及びエーテル脱脂後のアセトン抽出液のマウスのエールリッヒ腹水癌に対する抑制効果が発表されたのを契機として本品に対する一連の研究が始まり、1961年浮田らによ

1. 発明の名称

新規ホスファチジルコリンカルシウムとその製法

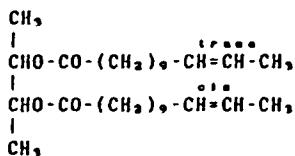
2. 特許請求の範囲

1 グリセリンのβ位及びα位にエステル結合する脂肪酸組成が、 $C_{14:0}$ 0.3, $C_{16:0}$ 17.8, $C_{16:1}$ 0.7, $C_{18:0}$ 1.0, $C_{18:1}$ 43.1, $C_{18:2}$ 36.2, $C_{18:3}$ 0.7 である新規ホスファチジルコリンカルシウム。

2 請求項1のホスファチジルコリンカルシウムが、ハトムギの種子に由来するものである請求項1記載の化合物。

3 ハトムギの種子のメタノール及びクロロホルム可溶性、アセトン難溶性画分をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することを特徴とする脂肪酸組成が、 $C_{14:0}$ 0.3, $C_{16:0}$ 17.8, $C_{16:1}$ 0.7, $C_{18:0}$ 1.0, $C_{18:1}$ 43.1, $C_{18:2}$ 36.2, $C_{18:3}$ 0.7 である新規ホスファチジルコリンカルシウムの製法。

ヨクイニンから抗腫瘍有効成分として Colxenolide (下式) と称する C_{18} 不飽和脂肪酸が 2, 3-ブタジオールと結合した脂質の単離が報じられたが、追試により存在は確認されなかった。



その後、近年に至るもヨクイニンから明確に制癌作用有りとされる特有成分は見つかっていない。

近年に至り、ヒドロキシラジカル OH^- 、ヒドロペルオキシラジカル HO_2^- 、スーパーオキシド O_2^- 、アルコオキシラジカル LO^- などの活性酸素種と発癌又は制癌作用との関係が注目されるようになり、不飽和脂肪酸の多量摂取が大腸癌の発癌と関連するかの疫学的研究結果が示されている。不飽和脂肪酸のエポキシ化が活性酸素種により起こることは周知であるが、他方、不飽和脂肪酸の摂取は食物として不可避的であるので、これら活性酸素種

の除去又は補足する作用を有する薬剤 (ラジカル・スカベンジャー) の開発は、ヒトの保健に重要な役割を有すべきことが予測される。

同様に、近年注目されている活性酸素種の影響は炎症時の発赤、腫張及び疼痛との関連である。炎症の引き金となるプロスタグランジン類の代謝物によって白血球が患部まで遊走し、活性酸素種と共に発赤、腫張及び疼痛などの症状を起こす。それ故、ラジカル・スカベンジャーによる活性酸素の不活化乃至封じ込めは、炎症防止のため意義を有することになる。しかしヨクイニン中にラジカル・スカベンジャーとして有効な成分が存在するやもこれまで知られていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

そこで本発明は、頭著なラジカル・スカベンジャー作用を有する新しいホスファチジルコリンカルシウムを提供すること及びこの物質をヨクイニンから抽出する方法を提供することを目的とする。

（以下余白）

【発明の構成】

【課題を解決するための手段】

(1) 概念

人好中球を opsonized zymosan で刺激して 4 種の活性酸素 (O_2^- ; H_2O_2 ; OH^- 及び化学ルミネスセンス) を產生させたときのヨクイニンエキスの挙動は既に報告されており (丹羽ら、皮膚科紀要、81, pp. 321-333(1986)、ヨクイニン油が好中球の產生する活性酸素を抑制し、かつ好中球やリンパ球の細胞膜のメチルトランスフェラーゼ、ホスホリバーゼ A_2 及びプロスタグランジン B_2 の產生を有意に抑制したことから、本油は炎症細胞膜に作用して細胞膜を安定化させる作用があるとされている。しかし、ヨクイニン油中の如何なる成分がラジカル・スカベンジャーとして有効であるかは未だ明らかでない。

(2) 概要

しかるに本発明者は、ヨクイニン脂質中の種々の成分につきラット好塩基性白血病細胞 (RBL-1) を用いて生物学的に検定した結果、該脂質中のホ

スファチジルコリン画分が抗炎活性を有する事実を確かめ、該画分の化学構造の解明とその抽出法の開発と併せ本発明に到達した。即ち、本発明は、

I グリセリンの β 位及び α 位にエステル結合する脂肪酸組成が、 $\text{C}_{14:0}$ 0.3, $\text{C}_{16:0}$ 17.8, $\text{C}_{16:1}$ 0.7, $\text{C}_{18:0}$ 1.0, $\text{C}_{18:1}$ 43.1, $\text{C}_{18:2}$ 36.2, $\text{C}_{18:3}$ 0.7 である新規ホスファチジルコリンカルシウム。

及び

II ハトムギの種子のメタノール及びクロロホルム可溶性、アセトン難溶性画分をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することを特徴とする脂肪酸組成が、 $\text{C}_{14:0}$ 0.3, $\text{C}_{16:0}$ 17.8, $\text{C}_{16:1}$ 0.7, $\text{C}_{18:0}$ 1.0, $\text{C}_{18:1}$ 43.1, $\text{C}_{18:2}$ 36.2, $\text{C}_{18:3}$ 0.7 である新規ホスファチジルコリンカルシウム製法。

を要旨とするものである。以下、発明の構成と関連する主要な事項につき項分けして述べる。

（以下余白）

(3) 新規ホスファチジルコリンカルシウムの構造解析

後記方法にてハトムギの種子(ヨクイニン)から単離され、那レシチンの標品と同一のTLCパターンを示すと共に、かつ生物学的検定により有効性を確かめた精製試料(NY-134(又はPC-1)3.7mgをホスホリバーゼCとpH7.4の0.1Mトリス緩衝液中インキュベート後、エーテルで抽出し、エーテル抽出部と水層を夫々TLCで検討して、上記試料がハトムギ由来のレシチンであると決定した。エーテル抽出部は、メタノール性水酸化ナトリウムでメタノール分解(メタノライシス)し、TLCで精製して遊離脂肪酸のメチルエステルを分離した。このエステルをガスクロマトグラフィーにより分析し、標品と対照した結果、第2図記載のクロマトグラムが得られ、この結果から試料の脂肪酸組成は下表-1の通りであることが判った。

(以下余白)

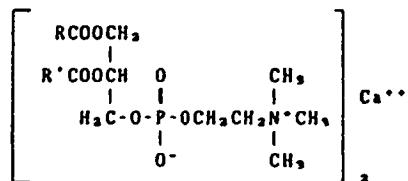
表-1

不飽和二重結合数	炭素数 / %		
	14	16	18
0	0.3	17.8	1.0
1	--	0.7	43.4
2	--	--	36.2
3	--	--	0.7

即ち本試料の構成脂肪酸は、少量のミリスチン酸、ヘキサデセン酸(二重結合の位置により三種の異性体が公知であるが、本試料の二重結合位置は未確定)、ステアリン酸及びリノレン酸と多量のパルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸とから構成され、構成脂肪酸中のパルミチン酸:オレイン酸:リノール酸の比は18:43:36であって、従来言われてきたヨクイニン油中の構成脂肪酸の1/2がオレイン酸、1/4がリノール酸とされる割合に比べてリノール酸の量がかなり多い。しかし、沼田らによるヨクイニン油中の制癌性分画の脂肪酸組成とは一致している(第43回日本癌学会

要旨集919頁(1984))。

原子吸光分析の結果、上記ホスファチジルコリンカルシウムは、その2molに対し1molのCa原子が恐らくイオン結合した下式の構造を有する。



(式中“R”は上述の脂肪酸残基を示す。)

(4) 新規ホスファチジルコリンカルシウムの製造

本発明のホスファチジルコリンカルシウムは、ハトムギ(*Coix lacryma-jobi L. var. ss-yuen* Stapf)及びジュズダマ(*C. Lachryma L.*)の種子に含まれる。従って、原料としてはどちらを用いてもよいが、後者は野生で栽培されておらず、しかも種皮が極めて硬いので原料の集荷及び取扱の面で不利である。これに反し前者は毎年圃場で栽培

でき、かつ種皮もそれ程硬くはないので、原料として適している。

上記ホスファチジルコリンカルシウムは、クロロホルムに良く溶け、低級脂肪族アルコールに可溶、低級脂肪族ケトンには溶け難い。従って、この性質を利用して、クロロホルム又はそれとメタノール等の低級脂肪族アルコールとの混液で全脂質を抽出後、アセトン又はメチルエチルケトン(MEK)などの溶媒で中性脂肪を除去した残部をシリカゲル、アルミナ等のクロマトグラフィーに付して目的成分を単離するのが常道である。但し、ホスファチジルコリンと同じ窒素原子含有ホスファチジン酸誘導体として、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等が夾雜し易いので、分析用又は生物検定用試料の作成には、溶出用混合溶媒の混合比を適宜変更するなどの配慮が必要である。4kgのヨクイニンを使用した製造試験における対象ホスファチジルコリンカルシウム(NY-134)の収量は0.81g(収率0.02%)であった。

〔作用〕

本発明のホスファチジルコリンカルシウムを上記RBL-1 細胞の培養物に加えて12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(5-HETE)、ロイコトリエンB₄(LTB₄)、12-ヒドロキシ-5,8,10-ヘアタデカトリエン酸(HHT)及び12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(12-HETE)の産生状況を高速液体クロマトグラフィーで追跡すると、起炎物質の一つであるHHT及び12-HETE(白血球誘引及び血管透過性抗進物質)の産生が抑制され、その効果は、HHTについては強力な抗炎性物質(HHT阻害剤)であるインドメタシンより弱く、また12-HETEについては12-HHT阻害剤であるエスクレチンより弱い。しかし上記新規ホスファチドは、HHT及び12-HETEの双方に対し阻害効果を示すので、天然物由来の緩和な抗炎剤として効果を期待できる。なお今後の研究によっては、既に実験動物癌に対し効果が確認されているヨクイニン油と同様の制癌作用も予期される。

100 検出器 (HETE及びHHT 用 240nm, LTB₄用 270nm), 逆相カラム YMC-A 302(4.6×150mm, 山村化学製)

③ 溶出剤: アセトニトリル: メタノール: 水: 酢酸(pH 4.0; 300:100:300:0.7(LTB₄用), 150:50:110:0.02(HETE類用)), 流量1.0 ml/min
 ④ TLC: 脂肪酸及びホスファチジルエタノールアミンに対しシリカゲルプレート (Merck), 溶媒1 クロロホルム-メタノール(6:1)、検出 10%硫酸; 溶媒2 クロロホルム-メタノール-水(65:24:4), 検出ニンヒドリン及びDittmer 試薬(J. Lip. Res., 5,126(1964)). ホスファチジルコリンに対しセルロースアレート(Merck), 溶媒ブタノール-酢酸-水(5:3:1), 検出 Hanes-Wilsherwood試薬(Nature, 164, 1107(1949)).

(c) 原子吸光分析: PC-1 4.3mgを20%塩酸-エタノール10mlに解かし、1%塩酸で10mlに調製して使用。

(d) PC-1 中のカルシウムの定性定量分析: 溶

〔実施例〕

以下、本発明に関する種々の実験結果につき記載するが、記載は勿論例示であって、発明思想の制限又は限定を意味するものではない。

(A) 使用材料及び方法

(a) 試薬

- ① ホスホリバーゼC: Sigma タイプI(クロストリジウムペルフリンゲンス由来)、活性: 4 単位/mg.
- ② ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルコリン: Faure の方法(Bull. Soc. Chem. Biol., 32, 503(1950))に従い調製。
- ③ 脂肪酸メチルエステル: NIH Mixtures (SRL Co., 米国製)。

(b) 分析

- ① GLC カラム: 10%エチレングリコールサクシネート, chromosorb W AW DMCS(2.6% × 2.1m), カラム温度 180°C, 検出器温度 200°C, N₂ ガス流量 50ml/min.
- ② HPLC: Varian Model 5000 LC, UV-

液1 mlに妨害抑制剤として塩化ランタン溶液を1%容の割に加え、日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計で炎光分析。炎光: ランプ電流 7.5 mA、波長 422.7 nm.

(c) PC-1 中のリンの定性定量分析: 試料を普通のキールダール法で処理し、反応物を Technicon Phosphor Autoanalyzer II-C型を用い、モリブデン青発色法により測定。

(B) 新規ホスファチジルコリンカルシウムの製造 (第1図参照)

国立中国農業試験場(福山市)で収穫されたハトムギの種子(ヨクイニン)4kgをクロロホルム-メタノール混液(2:1)11ml中で10分間均質化後、メタノール-0.1M 塩化カリ混液(1:1)でPolch 洗浄した。得られた全リビド分画(161 g)を溶媒として順次クロロホルム、アセトン及びメタノールを用い、シリカゲル・クロマトグラフィーに付し、夫々中性、ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルコリン分画を得た。

メタノール分画 (4.5g) をクロロホルム-メタノール混液 (9:1 及び 4:6) を用いて再度シリカゲルクロマトグラフィーに付し、ホスファチジルコリン分画 (PC-1) 0.81g を得た。なお、各試料の純度は、標品と TLC で検定した。
(C) 新規ホスファチジルコリンカルシウムの酵素分解

Ottolenghi (Methods Enzymol., 14, 188 (1969)) の方法により PC-1 をホスホリバーゼ C で加水分解した。即ち、PC-1 3.7mg をエーテル 2 mL 中に溶かし、これに 0.02M の塩化カルシウムを含む 0.1M のトリス緩衝液 (pH7.4) 0.1 mL を加え、室温で 16 時間インキュベートした。次いで、代謝物の溶液をエーテル可溶性の脂肪酸分画と水溶性のホスフォリコリン分画とに分け、前者の分画をイアトロピーズでクロマトグラフし、ヘキサン-ジエチルエーテル (2:1) の混液で溶出した。溶出物を TLC で卵黄由来ホスファチジルコリンの標品と比較した結果、試料 PC-1 はホスファチジルコリンであることが確認された。更に水層を凍結乾燥

後、セルロースプレートを用いて n-ブタノール-酢酸-水 (5:3:1) 混液で添加し、これに Hans-Isherwood 試薬を噴霧、60°C で 30 分間加熱、乾燥後、λ 254 nm の UV ランプ下で 15~25 分間照射した結果、試料と卵黄由来のホスファチジルコリンからの精製物との Rf 値が一致した (第 3 図参照)。

(D) アルカリ性メタノライシス

エーテル可溶性を岸本らの方法 (岸本ら, J. Lip. Res., 6, 435 (1965)) に従い、0.21M のメタノール性苛性ソーダを用い、室温で 30 分間メタノリシス後、生産的 TLC (溶媒ヘキサン: エーテル = 10:1) で精製し、脂肪酸のメチルエステルを得た。GLC による分析の結果、以下の酸組成が示された (第 2 図参照: (I): 標体、(II): 標準品)。

C_{14:0} 0.3, C_{16:0} 17.8, C_{16:1} 0.7,
C_{18:0} 1.0, C_{18:1} 43.4, C_{18:2} 36.2,
C_{18:3} 0.7.

(以下余白)

(E) 生物学的検定

(a) 略称

5-HETE: 5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸
12-HETE: 12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸
LTB₄: ロイコトリエン B₄
HHT: 12-ヒドロキシ-5, 8, 10-ヘプタデカトリエン酸

(b) 方法

逆相 HPLC によるラット肝癌細胞 (RBL-1) 中の LTB₄ と 5-HETE の抑制挙動の測定は寺尾らの方法 (J. Chem. Soc. Perk. In Trans. 1, 1591 (1983)) に従って行った。即ち、RBL-1 細胞を 10⁷ 個 / mL の割合で 10% の仔牛血清を加えた RPM-1640 培地中培養し、これにアラキドン酸 50 μg、カルシウム・イオノフォア (A-23187) 1 μg 及び種々の濃度の試料 (内部標準としての 2-(12-ヒドロキシデカ-5, 10-ジエニル)-3, 5, 6-トリメチ

ル-1, 4-ベンゾキノン), LTB₄ 及び 5-HETE に対する阻害剤)、インドメタシン (HHT に対する阻害剤) 及びエスクレチン (12-HETE に対する阻害剤) を含む。) を加え、更に 15 分間培養を続けた後、エタノールを加えて反応を停止させ、遠心して細胞を除き、上清中における代謝産物を HPLC により分析した。

ラット血小板により形成された HHT 及び 12-HETE の逆相 HPLC による測定は寺尾らの方法 (ビタミン 59 卷 (5-6 号) 211-219 (1985)) に従って実施した。

即ち、0.25 mL の血小板に富む血清をラットの血液から集め、10⁶ 細胞 / mL に調製した。これにアラキドン酸 125 μg、カルシウム・イオノフォア (A-23187) 1 μg を加え、37°C で 15 分間培養した。その後、エタノールを加えて反応を停止させ、反応混合物を遠心後、上清を HPLC にて分析した。

結果を下表-2 に示す。表示の如く、PC-1

(発明ホスファチジルコリンカルシウム)は、インドメタシンとエスクレチンを内部標準として用いたとき、 10^{-5} molの濃度でHHTと12-HETEに対し弱い阻害作用を示す。また標準品として2-(12-ヒドロキシデカ-5,10-ジエンイル)-3,5,6-トリメチル-1,4-ベンゾキノンを用いたとき、LTB₄と5-HETEに対し多少ながら阻害作用を示す。これに対し、中性脂肪及びホスファチジルエタノールアミンは、HHT, 12-HETE, LTB₄及び5-HETEのいずれに対しても全く抑制作用を示さなかった。従って、本発明成績体は、ある程度の抗炎性薬理作用を有すべきことが推定される。

表-2

薬剤/濃度 代謝物	PC-1(標準品)	標準品	イソドミタクソ	エスクレチン
	10^{-4} ~ 10^{-5} ~ 10^{-6}	10^{-4} ~ 10^{-5} ~ 10^{-6}	10^{-4} ~ 10^{-5} ~ 10^{-6}	10^{-4} ~ 10^{-5} ~ 10^{-6}
LTB ₄	- 25 16	- 100 94	- - -	- - -
5-HETE	- 14 10	- 99 99	- - -	- - -
HHT	55 14 0	- - -	98 48 24	- - -
12-HETE	49 17 0	- - -	31 34 20	81 55 22

【発明の効果】

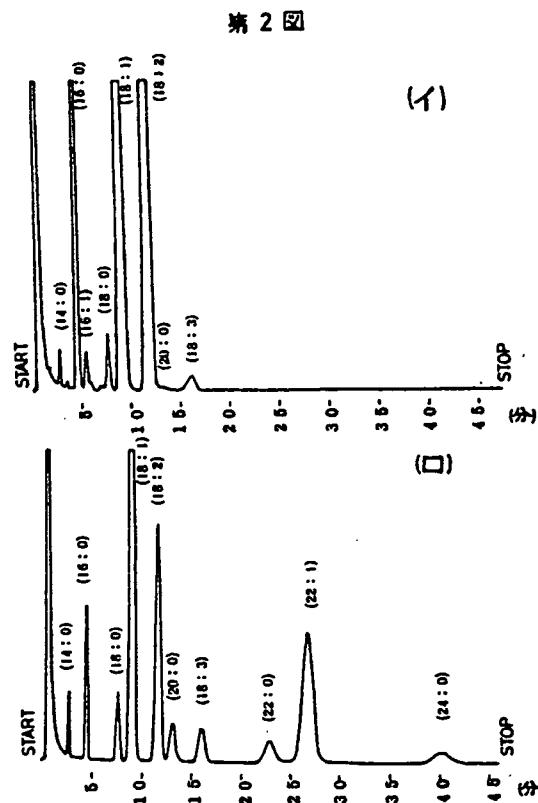
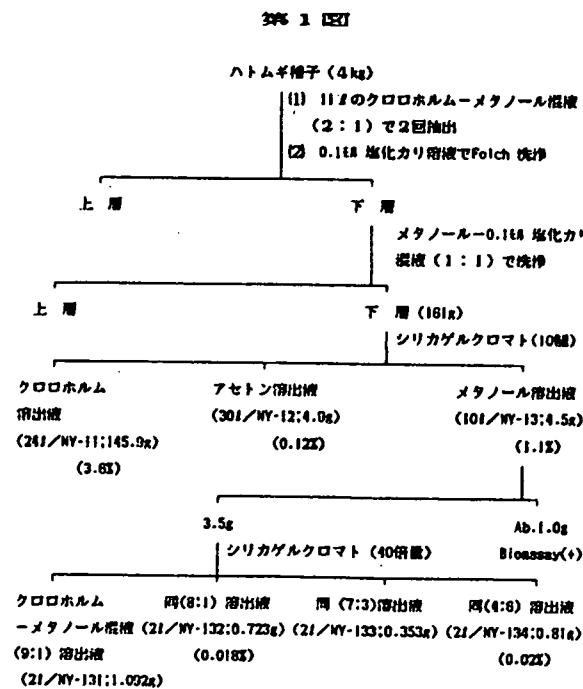
以上説明した通り、本発明は、活性酸素抑制剤乃至抗炎症剤等として有用な新規ホスファチジルコリンカルシウム及びこれを天然物から製造する方法を提供できたことにより、国民の健康増進及び健康維持に寄与しうる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ハトムギから新規ホスファチジルコリンカルシウムを製造する工程を示す工程図、第2図は、ハトムギ由来のホスファチジルコリンカルシウムを構成する脂肪酸のメチルエステルのガスクロマトグラム(イ)と標準混合脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム(ロ)、第3図は、発明ホスファチジルコリンカルシウム(ア)及び卵黄ホスファチジルコリン(ニ)の各酵素分解物のTLCパターンである。各図の説明は、夫々各図中に記載済み。

特許出願人 八木 長

代理人 弁理士 門脇 清



第3回

		dark yellow	yellow
NY-13	0	●	●
NY-131	+		●
NY-132	+	●	
NY-133	0	●	
NY-134	0	●	

10% H₂SO₄
reagentSolvent:
CHCl₃-MeOH
(6:1)

		blue	(+)
NY-13	0	●	●
NY-132	+	●	(+)
NY-134	+	●	
PC	0	●	(+)
PE	0	●	
SM	0	●	

Dittmer reagent
Ninhydrin
reagent (+)
Solvent:
CHCl₃-MeOH-H₂O
(65:24:4)

PC : phosphatidylcholine (lecithin)

PE : phosphatidylethanolamine

SM : sphingomyeline